

## LES LIPIDES DES FRONDES SPORIFÈRES DU SCOLOPENDRIUM VULGARE SM.

Par M. H. LAUR et C. GUERVIN

Dans une précédente note nous avons rapporté quelques résultats concernant les acides gras des lipides totaux des frondes sporifères d'une Filicinée (GUERVIN et LAUR, 1969). Les données bibliographiques sur les lipides chez ces végétaux étant peu nombreuses (SCHLENK et GELLERMAN, 1965 ; RADÜNZ, 1967 et HAIG et al., 1969), il nous a semblé intéressant de continuer à en préciser la nature ; aussi présentons-nous dans cet article les résultats relatifs aux principales classes de lipides rencontrées dans les sporophytes adultes du *Scolopendrium vulgare* Sm. (Filicinée Leptosporangiée), ces recherches s'inscrivant dans le cadre d'une étude lipochimique de certaines Cryptogames.

### Matériel et méthodes

Le matériel utilisé, des frondes sporifères du *S. vulgare*, a été récolté dans un thalweg humide de la forêt de Compiègne (exposition Nord), pendant la période des mois de novembre et de décembre.

Ce matériel est fixé par le mélange méthanol/chloroforme (1/2, v/v), après un court passage dans l'azote liquide. La solution ainsi obtenue étant recueillie, nous avons procédé à des épuisements successifs par le même mélange des restes du matériel végétal préalablement broyés ; ces épuisements sont poursuivis jusqu'à décoloration totale du broyat. Les liqueurs d'extraction réunies sont évaporées sous vide, à une température d'environ 25°C.

L'extrait lipidique brut total ainsi obtenu est lavé selon la technique de FOLCH et al. (1957) et repris par le chloroforme.

Le fractionnement des lipides totaux de cette solution chloroformique a été réalisé à l'aide de deux méthodes.

1. — *Séparation directe sur couche mince.* Dans ce cas les couches minces utilisées sont de deux types : soit des plaques préparées finies de Silice F 254 (MERCK 20 × 20 cm), soit des plaques de verre recouvertes d'une couche uniforme d'une épaisseur de 0,25 mm de silica-gel G. Ces plaques étant, avant utilisation, activées à 110°C pendant 30 minutes.

Nous avons employé comme solvant de développement le mélange hexanoxyde d'éthyle-méthanol (60/30/3, v/v/v) ; le temps moyen de l'éluion est alors de 45 minutes.

Une première révélation à l'iode nous a permis de mettre en évidence les principales taches, mais nous avons également révélé les chromatogrammes avec le mélange acide sulfurique-acide acétique (50/50, v/v), utilisé autant comme révélateur général que, plus spécifiquement, pour déceler les stérols.

Enfin, de manière à préciser la nature de certaines taches observées, nous avons eu recours, d'une part, à quelques révélateurs plus spécifiques comme les tri et pentachlorure d'antimoine, le réactif de Molisch ( $\alpha$ -naphтол), celui de Zinzadze, etc..., et, d'autre part, à l'emploi de témoins commerciaux chimiquement purs.

2. — *Chromatographie sur couches minces après séparation sur colonne.* La chromatographie sur colonne en verre de 1 cm de diamètre a été réalisée avec de l'acide silicique Bio-Sil H.A. 325 mesh transformé en bouillie épaisse à l'aide de 50 ml de chloroforme ; le poids d'acide silicique employé est égal à 40 fois le poids de lipides chromatographiés, qui est d'environ 0,5 g. Les éluations successives ont été effectuées avec 300 ml de chloroforme, 200 ml d'acétone et 300 ml de méthanol. Une légère surpression est créée à l'entrée de la colonne à l'aide d'un courant d'azote, comme le préconise MAZLIAK (1967).

La nature des éluats est contrôlée par chromatographies sur couche mince comme précisé ci-dessus ; toutefois, les solvants utilisés sont différents et dépendent de la fraction considérée. Pour la fraction extraite par le chloroforme, après avoir essayé les solvants suivants :

- A) chloroforme / méthanol / acide acétique / eau (170 / 25 / 25 / 4),
- B) diisobutylcétone / acide acétique / eau (80 / 50 / 10),
- C) chloroforme / méthanol / acide acétique (65 / 25 / 10),
- D) hexane / oxyde d'éthyle / acide acétique (90 / 10 / 1),

nous n'avons retenu pour la présentation que le mélange D qui nous a donné les meilleurs résultats.

Pour la fraction élue par l'acétone, c'est avec le solvant A que nous avons obtenu les séparations les plus nettes ; enfin, pour la fraction entraînée par le méthanol, après avoir fait appel aux mélanges A, B et C indiqués ci-dessus, c'est également avec le mélange solvant A que nous avons réalisé les chromatogrammes les plus expressifs.

Les révélateurs généraux utilisés sont l'iode et le mélange acide acétique-acide sulfurique (1/1, v/v) ; des révélations plus spécifiques, comme celles à l'anthrone pour les glycolipides ou encore la fluorescence en U.V. des différentes taches de phospholipides après dispersion sur les chromatogrammes de Rhodamine 6G, ont été pratiquées quand cela s'est avéré nécessaire ; par ailleurs, nous avons eu également recours à l'emploi de témoins commerciaux chimiquement purs, comme indiqué précédemment.

## Résultats

### A. — LES LIPIDES TOTAUX

La teneur en lipides totaux varie aux environs de 8,5 g-9 g pour cent grammes de matière sèche, ce qui représente environ 2 % du poids frais.

Le développement chromatographique sur couche mince d'un extrait des lipides totaux a donné les différentes taches reproduites sur la figure 1. Le tableau I rapporte les principales caractéristiques concernant ces taches.

L'analyse de ces résultats nous permet d'identifier, à partir des taches numérotées de 1 à 10, un certain nombre de composés.

TABLEAU I

Tableau synoptique des résultats concernant les lipides totaux du *S. vulgare* après chromatographie sur couche mince

N° tache	% poids des L.T	Couleur naturelle	Couleur fluorescence U. V.	Rf		Réactifs spécifiques				
				taches	témoins utilisés	zinzadze	CH <sub>3</sub> COOH/SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub>	SbCl <sub>3</sub>	SbCl <sub>5</sub>	α-naphtol
10	25	jaune	rouge	0,93			++	+	++	+
			faible							
9				0,73	0,75	triglycéride				
8	5	jaune paille faible	rouge faible	0,55						
7	4	peu visibles	rouge rose	0,44	0,43	diglycéride				
6			rouge rose	0,41						
5	13	vert foncé	rouge brillant	0,33	0,30	cholestérol		++	++	+
4		vert clair	rouge brillant	0,25						
3	15	vert jaune	de rose à rouge carmin	0,16	0,35 à 0,15	stigmastérol				
2	7	jaune intense		0,06	0,042	monoglycéride	+++	++	++	
1'	31	centre vert, tour gris	base blanche	0,03						
1					0,006					

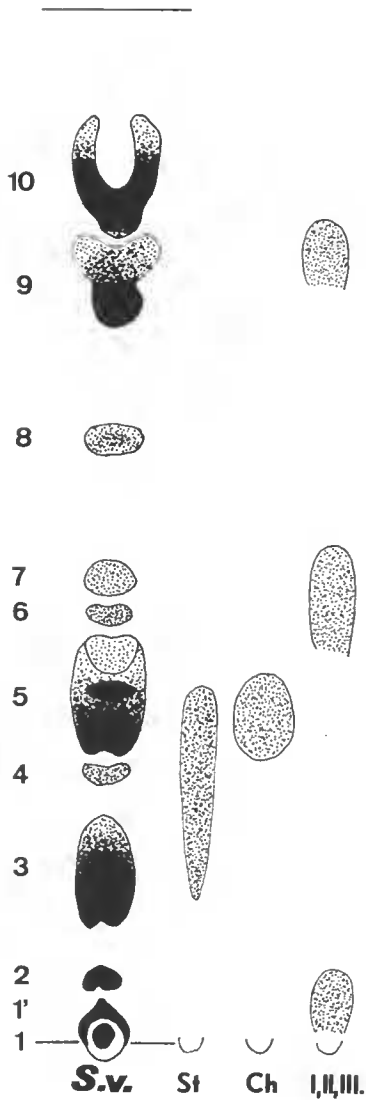


FIG. 1. — Chromatogramme sur couche mince de Silica-gel G. Solvant : hexane-oxyde d'éthyle-méthanol (60-30-3).

S.v. : lipides totaux extraits des frondes sporifères du *S. vulgare* ; St : stigmasterol ; Ch : cholestérol ; I, II, III : mélange de mono, di et triglycérides.

Les taches 1, 1', et 2 renferment les phospholipides et galactolipides comme l'attestent les réactions spécifiques ; de plus, les valeurs de Rf indiquent, plus précisément, que la tache 1' migre à peu près comme des monoglycérides ; la tache 2 qui migre également comme des monoglycérides a une réaction classique permettant de penser qu'elle renferme en outre des caroténoïdes (réactif de Carr et Price). Les taches 3, 4 et 5, par leurs couleurs naturelles et de fluorescence aux U.V., montrent qu'elles correspondent aux pigments chlorophylliens ; la tache 5 contient également des stérols et des acides gras libres ainsi que le précisent le Rf et les réactions spécifiques. Les taches 6 et 7 très faiblement pigmentées ont un Rf voisin de celui d'un diglycéride. La tache 8 est de nature inconnue ; néanmoins, elle correspond en chromatographie en phase gazeuse à un corps antérieurement appelé « Y » (GUERVIN et LAUR, *loc. cit.*) et qui possède une L.E.C. <sup>1</sup> nous permettant de supposer qu'il se rapproche chimiquement d'un acide hydroxypalmitique. La tache 9 par son Rf correspond aux triglycérides ; quant à la tache 10, ses réactions spécifiques nous permettent de dire que nous avons affaire à des esters de stérols.

#### B. — LES LIPIDES APRÈS CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Ce type de chromatographie nous livre avec les éléments utilisés les fractions suivantes :

— une fraction extraite par le chloroforme qui contient les lipides neutres et qui représente 58 % du poids des lipides totaux ;

— une fraction extraite par l'acétone qui comporte essentiellement des glycolipides et des pigments (chlorophylliens et autres) et qui correspond à 26 % du poids des lipides totaux ;

— enfin, une fraction extraite par le méthanol renfermant les lipides les plus polaires où les phospholipides sont les plus abondants et qui équivaut en moyenne à 16 % du poids des aliquotes utilisés.

##### 1<sup>o</sup> Les lipides neutres

Le chromatogramme de ces lipides neutres (1, fig. 2) nous donne huit taches. La comparaison avec les témoins choisis ( $\beta$ -sitostérol, mélange de mono, di et triglycérides) et les valeurs de Rf reproduites dans le tableau II, nous permettent les identifications suivantes :

les taches n<sup>os</sup> 1 et 2 correspondent à des pigments ;

la tache n<sup>o</sup> 3 (double tache) correspond pour partie aux stérols libres et pour partie aux monoglycérides ;

la tache n<sup>o</sup> 4 est un produit non identifié actuellement ;

la tache n<sup>o</sup> 5 est assimilable aux diglycérides ;

la tache n<sup>o</sup> 6 a une position telle que, en se référant d'une part aux résultats obtenus par DI COSTANZO et coll. (1967) et d'autre part aux témoins employés, nous sommes conduits à penser qu'elle est composée d'acides gras libres : notons qu'ils sont particulièrement abondants dans ce matériel ;

la tache n<sup>o</sup> 7 correspond aux triglycérides ;

quant à la tache n<sup>o</sup> 8, la plus élevée, la couleur rosée qu'elle prend avec le mélange acétique / acide sulfurique nous laisse supposer qu'il s'agit d'esters de stérols (stérides).

1. L.E.C. = Longueur équivalente de chaîne.

TABLEAU II

Tableau synoptique des résultats concernant les différentes fractions des lipides totaux du *S. vulgare* après séparation sur colonne d'acide silicique et chromatographie sur couche mince.

PHASE LIPIDES NEUTRES				PHASE ACÉTONE			PHASE LIPIDES POLAIRES											
N° tache	Rf			n° tache	Rf lipides S. v.	anthrone	n° tache	Rf										
	lipides S.v.	témoins						lipides S. v.	témoins									
		Phytost.	MG, DG, TG, glycérides	13 Pig.	0,94													
						12 Pig.	0,90											
						11 Pig.	0,87 à 0,73											
						10	0,70											
						9 Pig.	0,65		9 Pig.	0,96								
8	0,55					8	0,60	+++	8	0,85								0,88
7	0,42				0,43 (TG)	7	0,52		7 Pig.	0,80								
6	0,25					6	0,46	+++	6	0,69								
5	0,15				0,15 (DG)	5	0,38		5	0,60								0,58
4	0,11					4	0,27		4	0,41								0,52 et 0,42
3	0,06	0,042	0,054 (MG)	3	0,18	+++	3	0,21								0,22		
2 Pig.	0,025				2	0,14			2									0,11
1 Pig.	0,00					1	0,04		1	0,03	0,03							

### 2° La fraction éluée par l'acétone

Le développement du chromatogramme (2, fig. 2) met en évidence treize taches. Trois d'entre elles sont rapportées à des glycolipides et sulfolipides en raison de la présence de sucre révélé par l'anthrone : ce sont les taches 3, 6 et 8. Leurs Rf sont respectivement 0,48 — 0,46 — 0,60 (fig. 2) avec le mélange éluant utilisé.

Une étude ultérieure nous permettra de préciser la nature chimique de chacun de ces glycolipides.

Les taches n<sup>os</sup> 9, 11, 12 et 13 correspondent à des pigments ; les autres : 1, 2, 4, 5, 7 et 10, sont de nature indéterminée actuellement.

### 3° Les lipides polaires

Une identification des neuf taches obtenues après séparation des constituants de cette troisième fraction (3, fig. 2) est permise grâce à l'utilisation de témoins commerciaux, de certaines colorations spécifiques et de l'observation aux U.V. après révélation à la rhodamine 6G.

la tache n<sup>o</sup> 1 est composée principalement de phosphatidylsérine (bleuâtre en U.V. à la rhodamine 6G) ;

les taches n<sup>os</sup> 2 et 3 s'interpénètrent et migrent comme la phosphatidyleholine ;

la tache n<sup>o</sup> 4, par sa couleur de fluorescence orangée pâle après évaporation de rhodamine 6G et par sa valeur de Rf, laisse supposer qu'elle est constituée de phosphatidyléthanolamine ;

la tache n<sup>o</sup> 5 a un Rf proche de celui d'un diphosphatidylglycérol (cardiolipine) ;

la tache n<sup>o</sup> 6 n'a pas été identifiée ;

la tache n<sup>o</sup> 8 est très probablement constituée par de l'acide phosphatidique ;

quant aux taches 7 et 9, elles correspondent à des pigments.

## Discussion et conclusion

La teneur en lipides totaux (9 %) des frondes sporifères du *S. vulgare* est importante comparée à celle d'autres végétaux (DI COSTANZO, 1967). Elle se rapproche du taux des lipides correspondant à certaines graines de Phanérogames (MAZLIAK, 1968).

Si nous confrontons les résultats obtenus précédemment sur les acides gras (GUERVIN et LAUR, *loc. cit.*) à ceux rapportés dans cette note, nous pouvons en déduire certaines précisions sur les lipides totaux présents dans les sporophylles de cette Fougère.

---

### ABRÉVIATIONS DU TABLEAU II

Pig. : pigments

PC : phosphatidylcholine

PS : phosphatidylsérine

PE : phosphatidyléthanolamine

PGP : diphosphatidylglycérol (cardiolipine)

PI : phosphatidylinositol

A.P. : acide phosphatidique

Phytost. : phytostérol ( $\beta$ -sitostérol)

MG, DG, TG-glycérides : mélange de mono, di et triglycérides.

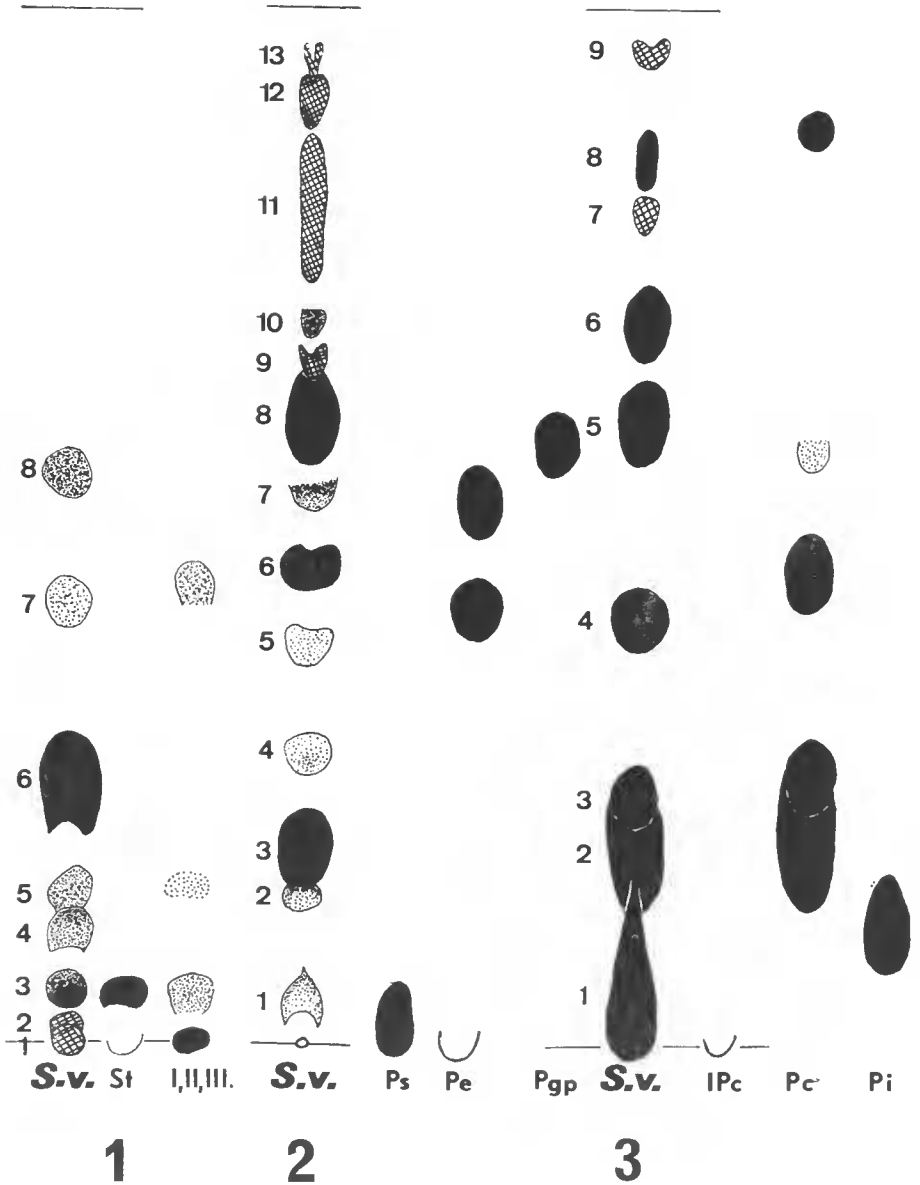


FIG. 2. — Chromatogrammes sur couche mince après séparation des lipides totaux sur colonne d'acide silicique.

1. Phase des lipides neutres ; solvant : hexane — oxyde d'éthyle — acide acétique (90-10-1).
2. Phase des lipides extraits par l'acétone ; solvant : chloroforme — méthanol — acide acétique — eau (170-25-25-4).
3. Phase des lipides polaires ; solvant : chloroforme — méthanol — acide acétique — eau (170-25-25-4).

Les taches représentées à l'aide de traits entrecroisés correspondent aux pigments.

S.v. : lipides du *S. vulgare* ; St :  $\beta$ -sitostérol ; I, II, III : mélange de mono, di et triglycérides ; Ps : phosphatidylsérine ; Pe : phosphatidylétanolamine ; Pgp : diphosphatidylglycérol ; lpc : lysophosphatidylcholine ; Pc : phosphatidylcholine ; Pi : phosphatidylinositol.



— La composition en acides gras de la tache « 1 », qui renferme les phospholipides et où l'on trouve 27 % d'acide palmitique, 16 % d'acide linoléique et 35 % d'acide linoléique, est très proche de celle qui se retrouve chez les chloroplastes de Fougères (WOLF et al, 1965) et chez certains végétaux supérieurs (DI COSTANZO et al., 1967).

— La tache « 2 », qui contient également des phospholipides mais qui, surtout, migre comme des monoglycérides, est essentiellement constituée (50 %) d'acide palmitique.

— Les taches « 3 » et le groupe « 4 — 5 et 6 » colorés par les pigments chlorophylliens ne diffèrent que par leurs taux en acides palmitique et palmitoléique, qui représentent, pour « 3 » comme pour « 4 — 5 — 6 », environ 50 % des acides gras mis en évidence.

— Les taches « 9 » et « 10 », qui migrent pour partie (« 9 ») comme des triglycérides, sont surtout composées d'acides gras insaturés (acides oléique et linoléique) alors que l'acide palmitique y est deux fois moins abondant. Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par SCILENK (1965) pour d'autres Fougères et semblent caractéristiques de ce type de matériel par rapport à d'autres Cryptogames où, au contraire, l'acide palmitique est prépondérant dans les triglycérides (LAUR, 1965).

Après séparation des lipides totaux sur colonne d'acide silicique, nous voyons que les pourcentages en poids des différentes fractions obtenues sont très voisins de ceux rencontrés chez le *Dactylis glomerata* par DI COSTANZO et al. (*loc. cit.*); il semble donc que ces résultats soient significatifs non pas des Ptéridophytes, mais bien plutôt de certains végétaux chlorophylliens. Enfin, il apparaît que les frondes sporifères du *S. vulgare*, caractérisées, quant aux acides gras, par la présence de C16 et surtout par celle des C18 mono, di et tri-insaturés en proportions sensiblement équivalentes, contiennent, d'une part, des lipides neutres où acides gras libres et triglycérides sont les plus représentatifs, et, d'autre part, des lipides polaires composés, outre trois glycolipides, de phospholipides parmi lesquels il faut souligner la présence certaine des composés acylés de la phosphatidylsérine, de la phosphatidylcholine, de la phosphatidyléthanolamine et du diphosphatidylglycérol.

Équipe Paquot, C.N.R.S., rue H. Dunant, 94-Thiais  
et Laboratoire de Biologie végétale appliquée  
61, rue de Buffon, Paris 5<sup>e</sup>.

### Résumé

Une analyse des lipides extraits de frondes sporifères du *Scolopendrium vulgare* Sm. a été réalisée après chromatographie sur colonne d'acide silicique et chromatographie sur couche mince. Elle nous a permis de mettre en évidence la présence, d'une part, de lipides neutres principalement représentés par des acides gras libres et des triglycérides et, d'autre part, de lipides polaires composés, outre trois glycolipides, de phospholipides parmi lesquels il convient de souligner l'existence de phosphatidylsérine, de phosphatidylcholine, de phosphatidyléthanolamine et de diphosphatidylglycérol.

### Summary

An analysis of lipids extracted from sporifered fronds of *Scolopendrium vulgare*, was made after column chromatography of silicic acid and thin-layer chromatography. It enabled us to reveal the presence on the one hand of neutral lipids mainly

represented by free fatty acids and triglycerids and on the other hand of polar lipids made up with 3 glycolipids and phospholipids among which it is necessary to point out the existence of phosphatidylserine, phosphatidyleholine, phosphatidylethanolamine and diphosphatidylglycerol.

#### BIBLIOGRAPHIE

- DI COSTANZO, G., C. JAILLET, J. CLÉMENT, et J. M. LEFEBVRE, 1967. — Sur les lipides des feuilles de *Dactylis glomerata* L. Étude analytique. *C. R. Acad. Sci., Paris*, D, **265**, pp. 371-373.
- FOLCH, J., M. LEES, et G. H. SLOANE-STANLEY, 1957. — A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. chem.*, **226**, p. 497.
- GUERVIN, CL., et M. H. LAUR, 1969. — Les acides gras des frondes sporifères du *Scolopendrium vulgare* Sm. *C. B. Acad. Sci., Paris*, D, **269**, pp. 583-585.
- HAIGH, W. G., R. SAFFORD, et A. T. JAMES, 1969. — Fatty acid composition and biosynthesis in ferns. *Biochem. Biophys. Acta*, **176**, 3, p. 647.
- LAUR, M. H., 1965. — Les lipides de quelques Rhodophycées (Recherches cytologiques, chimiques et physiologiques). *Rev. gén. Bot.*, **72**, pp. 57-142.
- MAZLIAK, P., 1967. — Recherches sur le métabolisme des glycérides et des phospholipides dans le parenchyme de Pomme — I. Analyse des lipides à l'aide de diverses techniques chromatographiques. *Phytochemistry*, **6**, pp. 687-702.
- 1968. — Le métabolisme des lipides dans les plantes supérieures. 1 vol., 223 p. Masson, Paris.
- et A. BEN ABDELKADER, 1968. — Application de la chromatographie sur couche mince à l'analyse des phospholipides et galactolipides des végétaux. *Qual. Plant. Mat. végét.*, **16**, pp. 176-196.
- RADÜNZ, A., 1967. — Über die Lipide der Pteridophyten — I. Die Isolierung und Identifizierung der Polyensäuren, *Phytochemistry G.B.*, pp. 399-406.
- SCHLENK, H., et J. L. GELLERMAN, 1965. — Arachidonie, 5, 11, 14, 17 — Eicosatetraenoic and related acids in plants. Identification of unsaturated fatty Acids. *J. Amer. oil chem. Soc.*, **42**, 6, pp. 504-511.
- WOLF, F. T., J. G. CONIGLIO et R. B. BRIDGES, 1965. — The fatty acids of chloroplasts. *Biochem. chloroplasts Proc.*, **1**, pp. 187-194.